

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 10 FEB 2005

WIPO

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL
(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande Internationale No. PCT/FR 03/03665	Date du dépôt International (jour/mois/année) 10.12.2003	Date de priorité (jour/mois/année) 13.12.2002
Classification Internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N1/20		
Déposant INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPE..., et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.

2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.

Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 5 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- I Base de l'opinion
- II Priorité
- III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV Absence d'unité de l'invention
- V Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI Certains documents cités
- VII Irrégularités dans la demande Internationale
- VIII Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire Internationale 06.04.2004	Date d'achèvement du présent rapport 09.02.2005
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Trommsdorff, M N° de téléphone +49 89 2399-7361



RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n°

PCT/FR.03/03665

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les éléments de la demande internationale (les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)) :

Description, Pages

2-13 telles qu'initiallement déposées
1. 1a reçue(s) le 03.01.2005 avec lettre du 03.01.2005

La partie de la description réservée au listage des séquences, Pages

1.2 telles qu'initiallement déposées

Revendications. No.

recue(s) le 03.01.2005 avec lettre du 03.01.2005

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: ..., qui est: ...

- la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminé**s divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listages des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- de la description, pages :
- des revendications, nos :
- des dessins, feuilles :

5. Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport.)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration			
Nouveauté	Oui:	Revendications	8
Activité inventive	Non:	Revendications	1-7, 9-11
	Oui:	Revendications	8
Possibilité d'application industrielle	Non:	Revendications	1-7, 9-11
	Oui:	Revendications	1-11
	Non:	Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

1. Documents cités

D1: DRANCOURT MICHEL ET AL: "16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 38, no. 10, octobre 2000 (2000-10), p.3623-30, ISSN: 0095-1137

D2: FARROW JOHN A E ET AL: "Phylogenetic interrelationships of round-spore-forming bacilli containing cell walls based on lysine and the non-spore-forming genera Caryophanon, Exiguobacterium, Kurthia, and Planococcus." INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 44, no. 1, 1994, p.74-82, ISSN: 0020-7713

D3: FRUEHLING ANJA ET AL: "Exiguobacterium undae sp. nov. and Exiguobacterium antarcticum sp. nov." INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol. 52, no. 4, juillet 2002 (2002-07), p.1171-6, ISSN: 1466-5026

D4: DATABASE EMBL [Online] Exiguobacterium acetylicum 16S rRNA gene 10 juillet 1995 (1995-07-10), NAKAGAWA ET AL.: extrait de EBI Database accession no. D55730

D5: US-A-6 022 537 (GARCIA JEAN-LOUIS ET AL) 8 février 2000 (2000-02-08)

2. Concernant le point V

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

2.1. La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 33(1) PCT, l'objet des revendications 1-6 n'étant pas conforme au critère de nouveauté défini par l'article 33(2) PCT.

La demande a pour objet une souche bactérienne désignée *Exiguobacterium lactigenes* sp. nov. caractérisée par sa séquence ARN ribosomal 16S et son utilisation pour la production de lactate.

Le document D1 décrit la classification d'une large collection de bactéries par le séquencage de leur ARN ribosomal 16S.

Le clone 18 (déposé sous le no. AF227839) présente 98.2% d'identité sur 1492 nucléotides avec la séquence revendiquée et est donc destructeur de nouveauté pour l'objet des revendications 1-3 et 6 (Art. 3(2) PCT). Le fait que dans la revendication 1 le genre de la souche bactérienne est précisé être *Exiguobacterium lactigenes* ne représente pas une vraie caractéristique

technique, qui suffirait à différencier ladite souche de l'art antérieur, étant donné qu'il s'agit là d'une désignation arbitraire donnée par les inventeurs.

D2 analyse les séquences ARNr 16S de différentes espèces bactériennes et les compare avec d'autres espèces connues. Entre autre l'ARNr 16S d'Exiguobacterium aurantiacum est séquencé, la séquence présente 97.4% d'identité avec la séquence revendiquée et est donc destructrice de nouveauté pour l'objet des revendications 1-3 et 6 (Art. 33(2) PCT).

D3 divulgue les séquences ARNr 16S de quatre espèces bactériennes différentes. Le clone H2T est caractérisé par un ARNr 16S ayant 93.8% d'identité avec la séquence revendiquée et détruit donc la nouveauté des revendications 1, 2 et 6(Art. 33(2) PCT).

L'ARNr 16S du clone d'Exiguobacterium acetylicum divulgué dans D4 est 93.6% identique à la séquence revendiquée et détruit donc aussi la nouveauté des revendication 1, 2 et 6 (Art. 33(2) PCT).

Les revendications 4, 5 et 7 dépendent de la revendication 1 et englobent donc, elles aussi, n'importe quelle souche bactérienne s'hybridant sur quelques nucléotides avec la séquence ID No. et présentant en plus une des caractéristiques techniques indiquées. Il est certain qu'un grand nombre de souches décrites dans D1-D4 présente de façon implicite ces caractéristiques: ces revendications manquent donc également de nouveauté (Art. 33(2) PCT). Une limitation à un haut degré d'identité avec la séquence ID No.1 suffirait à rétablir la nouveauté.

D5 décrit une souche bactérienne ayant des propriétés très similaires à la souche revendiquée(t° optimale, pH optimum, etc.), mais du genre Lactobacillus.

D5 décrit par ailleurs l'utilisation de cette souche thermotolérante pour la production d'acide lactique.

Au vu de D5, les méthodes des revendications 9-11 manquent d'activité inventive (Art. 33(3) PCT).

2.2. Au vu des documents cités ci-dessus, la souche revendiquée à la revendication 8 représente une nouvelle souche du genre Exiguobacterium.

Bien qu'elle soit caractérisée par un ARNr 16S présentant une forte homologie avec celui d'autres souches de l'art antérieur, aucun des documents cités ne

suggère l'existence de cette nouvelle souche.

La revendication 8 est donc nouvelle et inventive (Art. 33(1)-(3) PCT).

2.3. L'objet des revendications 1-11 a une application industrielle dans le domaine agronomique (Art. 33(4) PCT).

REVENDICATIONS

1/ Souches bactériennes, caractérisées en ce qu'il s'agit d'*Exiguobacterium* du genre *lactigenes* et qu'elles possèdent une séquence d'ADN dont au moins une partie est capable de s'hybrider avec de l'ADN génomique ou plasmidique 5 de la souche déposée le 5 décembre 2002, sous le n° I-2962, à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.).

10 2/ Souches bactériennes selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'au moins 70 % de leur génome est capable de s'hybrider avec l'ADN de la souche déposée.

15 3/ Souches bactériennes selon la revendication 1 ou 2, caractérisées par la séquence SEQ ID N°1 de l'ARNr 16S :

GGTGGCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAGCCGTCTGAGCCCTCGGGGGGACGACGGTGGAAATGAGCGGC
GGACG
GGTGGAGTAACACGTAAAGAACCTCCCCATAGGTCTGGGATAACCACGAGAAATCGGGCTAATACCGGATGTGTC
ATCGG
20 ACCGGATGGTCCGCTGATGAAAGGCCTCCGGCTCGCCCATGGATGGCTTGGGGTGCATTAGCTAGTTGGTGG
GGTAA
CGGCCCAACCAAGGCAGCGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGA
CTCCG
25 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGC
TTTCG
GGTCGTAAAGTTCTGTTGTAAGGGAAAGAACAAAGTGCCTCAGGCAATGGCGCACCTTGACGGTACCTTGCGAGAA
AGCCA
30 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAAATTATGGCGTAAAGGCC
GGCCA
GGCGCCTTTAAGTCGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGAGGGCAATGGAAACTGGGAGGCTTGAGTA
TAGGA
GAGAAGAGTGGAAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGGCTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCT
TTGGC
35 CTATAACTGACGCTGAGGCTGCAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGA
GGCTAGGGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGAAGCTAACCGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGAGTACGGT
CGCAA
GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGACAAGCGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAACGCCAG
AACCT
40 TACCAACTCTTGACATCCCCCTGACCGGTACAGAGATGTACCTTCCCTTCGGGGCAGGGTGACAGGTGGTGC
ATGGT
TGTGGTCAGCTCGTGTGGTGAAGATGTGGTTAACCTCCGCAACGAGCGAACCCCTGTCCCTAGTGTCCAGCAT
TnAGT
45 TGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATG
AGTTG

PCT/FR03/03665

15

GGCTACACACGTGCTACAAATGGACGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAGCCGTT
CTCAG
TTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAAGCATACTGCCGTGAA
TACGT
5 TCCCAGGTCTTGTACACACCGGCCGTACACACCGAGAGTTGCAACACCCGAAGTCGGTAGGTAAACCGTAAGG
AGCCA
GCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGNTTGGGTGAAGTCGTAACAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCCGTGA

ou une séquence ayant une similitude avec SEQ ID N°1
10 supérieure à 97%.

4/ Souches bactériennes selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce qu'elles sont thermotolérantes, saccharolytiques et amylolytiques et/ou capables de produire du L(+)lactate.

15 5/ Souches selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées par des propriétés de croissance à des températures de l'ordre de 40 à 50°C, à un pH de 5,4 à 9,15, avec un optimum pour la croissance à 45°C, à un pH de 7 environ.

20 6/ Souches bactériennes selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisées par une teneur de leur ADN en guanine et cytosine de 50 mole% environ.

25 7/ Souches bactériennes, caractérisées en ce qu'il s'agit d'*Exiguobacterium* du genre *lactigenes* et qu'elles possèdent une séquence d'ADN dont au moins une partie est capable de s'hybrider avec de l'ADN génomique ou plasmidique de la souche déposée le 5 décembre 2002, sous le n° I-2962, à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.), ces souches étant thermotolérantes, 30 saccharolytiques et amylolytiques et/ou capables de produire du L(+)lactate, ayant des propriétés de croissance à des températures de l'ordre de 40 à 50°C, à un pH de 5,4 à 9,15, avec un optimum pour la croissance à 45°C, à un pH de 7 environ, et une teneur de leur ADN en guanine et cytosine de 35 50 mole% environ.

8/ Souche bactérienne déposée à la C.N.C.M. le 5 décembre 2002, sous le numéro I-2962.

9/ Procédé de culture de souches bactériennes selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'on opère dans des conditions anaérobies facultatives, à un pH de 5,4 à 9,15 environ, à 37°C, en particulier de 6,5 à 7,5, dans un milieu de base contenant un sucre utilisable par ces souches comme source d'énergie.

10 10/ Application des souches bactériennes selon l'une des revendications 1 à 8, dans des procédés de fermentation alimentaire.

11/ Procédé de production de métabolites tels que le L(+) lactate, caractérisé en ce qu'il comprend

15 - la culture d'une souche bactérienne selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 dans des conditions appropriées pour son développement et pour la production du métabolite recherché,

20 - la récupération des métabolites produits, l'isolement du métabolite désiré et sa purification.

PCT/FR03/03665

1

SOUCHE BACTERIENNES DU GENRE *EXIGUOBACTERIUM*
PROCEDE DE CULTURE ET APPLICATIONS

L'invention a pour objet de nouvelles souches du genre *Exiguobacterium*.

Elle vise également un procédé de culture de ces souches,
ainsi que leurs applications industrielles.

L'invention se rapporte plus particulièrement à des souches bactériennes telles qu'isolées d'échantillons provenant de systèmes hydrothermaux marins profonds.

10 Dans *Journal of Clinical Microbiology*, vol 38, n°10, October 2000, p.3623-30, Drancourt et al rapportent les résultats de l'étude d'une collection de 177 isolats de sources diverses et de leur identification sur la base des ARNr.

15 Mais les espèces données de ce tableau sont très éloignées des souches de l'invention.

Dans l'article paru dans *International Journal of systematic bacteriology*, vol 44, n°1, 1994, p. 74-82, Farrow et al décrivent des études comparatives entre différentes 20 espèces. Le genre *Exiguobacterium* est mentionné, mais aucune précision n'est donnée sur les espèces.

L'article de Frühling et al dans *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol 52, n°4, juillet 2002, p.1171-6, on rapporte des souches de *Exiguobacterium undae* sp.nov. et de *Exiguobacterium antarcticum* sp.nov. isolées à partir de l'eau de mares.

Ces souches et les autres espèces du genre *Exiguobacterium* données ont des positionnements phylogénétiques très éloignés des souches de l'invention.

30 Le document Data base EMBL, n° d'accesion D 55730, donne l'ARNr 16 S d'un clone d'*Exiguobacterium acetylicum*, ce qui

PCT/FR03/03665

1a

correspond aussi à une espèce différente de celle de l'invention.

Ces documents rapportent respectivement, la séquence de l'ARNr 16 S de *Exiguobacterium aurantiacum* (NDCDO 2321) et de 5 *Exiguobacterium undae*. Les commentaires donnés ci-dessus en rapport avec le document Data base s'appliquent également.

L'étude par les inventeurs des échantillons prélevés les a conduit à isoler une nouvelle espèce d'*Exiguobacterium* présentant des propriétés de grand intérêt dans divers 10 domaines de l'industrie.

L'invention a donc pour but de fournir des souches de cette nouvelle espèce.

Elle vise également à fournir des protocoles de culture de ces souches précisant les conditions physico-chimiques et 15 la composition du milieu de culture qui permettent de produire favorablement des cellules et/ou certains métabolites, plus particulièrement du L(+) lactate.

Selon un autre aspect, l'invention vise l'utilisation directe de ces souches ou celle de leurs métabolites dans 20 divers domaines de l'industrie.

Les souches bactériennes de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles possèdent une séquence d'ADN dont au moins une partie est capable de s'hybrider avec de l'ADN génomique ou plasmidique de la souche déposée le 5 décembre 2002, sous le 25 n° I-2962, à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.), 25 rue du Docteur Roux, 75015 PARIS.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.